



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES

# “PLATAFORMA TILLING PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES EN TOMATE”

TRABAJO FIN DE MÁSTER DE INVESTIGACIÓN

MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

Alumna: Sandra Bretones Amate

Tutor: Juan Capel Salinas

Septiembre, 2015



# AGRADECIMIENTOS

---

Con este Trabajo Fin de Máster termina una etapa que me ha aportado numerosos conocimientos, es por ello que quiero dar las gracias a todo el profesorado del Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. En especial me gustaría dar las gracias a Rafael Lozano, Juan Capel y Trinidad Angosto por trasmitirme su pasión por la biotecnología vegetal.

Al Grupo de investigación AGR-176, el cual me ha acogido durante estos meses como uno más y me ha permitido adorar un poquito más el magnífico mundo de la investigación. En concreto a Juan Capel, por haber confiado en mí para la realización de este proyecto y a Fernando Pérez, quien ha sabido aguantarme durante estos meses y sin el cual este proyecto no se podría haber hecho realidad.

A mis compañeros del Máster, los cuales espero que sean de aquí a un tiempo no muy lejano unos excelentes biotecnólogos, y en especial a mis chicas y a Félix, sin los cuales este año no habría sido el mismo.

A mi familia y a Gustavo, gracias por motivarme a seguir adelante y por apoyarme en todo momento.

# ÍNDICE

---

<b>Resumen</b>	5
<b>1. Introducción</b>	6
1.1 El tomate: taxonomía e importancia del cultivo	6
1.2 Variabilidad genética de tomate	7
1.3 Mejora genética	7
1.4 Mutagénesis	9
1.5 <i>Targeting Induced Local Lesions IN Genomes</i> (TILLING)	11
1.6 <i>High Resolution Melting</i>	13
1.7 Aplicación de TILLING para la identificación de polimorfismos	15
<b>2. Materiales y métodos</b>	17
2.1 Material vegetal	17
2.2 Extracción de ADN genómico	18
2.3 Cuantificación de ADN y construcción de <i>pools</i>	19
2.4 Amplificación del fragmento de interés mediante PCR	20
2.5 HRM	21
2.6 Purificación de producto de PCR	22
2.7 Reacción de secuenciación y precipitación de ADN	23
2.8 Secuenciación y alineamiento de las secuencias	24
<b>3. Resultados</b>	25
3.1 Germinación de las semillas y extracción de ADN	25
3.2 Extracción, cuantificación de ADN y formación de <i>pools</i>	26
3.3 Optimización condiciones PCR y HRM	27
3.4 HRM	28
3.4.1 Puesta a punto de la plataforma TILLING	28
3.4.2 Genética reversa	29
3.5 Caracterización del polimorfismo	31
<b>4. Discusión</b>	33
<b>5. Conclusión</b>	36
<b>6. Bibliografía</b>	37

## RESUMEN

---

La secuenciación del genoma de *Solanum lycopersicum* L. ha permitido desarrollar estrategias de genómica funcional que hasta el año 2000 eran casi impensables, como el desarrollo de estrategias de Genética reversa. Entre estas, la denominada TILLING (*Targeting Induced Local Lesion IN Genomes*), combina la eficiencia de mutágenos químicos, como el EMS, con un método de alta resolución que permite la identificación de polimorfismos en un solo nucleótido mediante el análisis de las curvas de fusión de ADN (*High Resolution-Melting o HRM*).

En este trabajo se ha puesto a punto una plataforma TILLING de tomate, para la que ha sido necesario extraer ADN de una población compuesta por 2688 familias M<sub>2</sub>. La cuantificación de todos esos ADN ha permitido la creación de conjuntos, o *pools*, en los que, mediante amplificación y análisis de las curvas de fusión de ADN, realizar un rápido rastreo de cualquier mutación. La funcionalidad del método se ha comprobado detectando el mutante *falsiflora*, previamente caracterizado, incluido como control positivo. La utilización de la plataforma nos ha permitido identificar polimorfismos en el gen *SL20268i*, que muestra ligamiento con varios caracteres de interés agronómicos como son el contenido en ácidos y sólidos solubles de los frutos. Puede concluirse por tanto que la plataforma TILLING se ha desarrollado con suficiente resolución como para detectar polimorfismos en un único nucleótido. Esta información puede suponer una gran aportación a la genómica funcional de tomate, ya que permitirá la identificación de polimorfismos en genes concretos sin necesidad de estudios genéticos previos, de forma rápida y eficiente. La posterior caracterización fenotípica detallada de los mutantes identificados permitirá avanzar en el conocimiento de las funciones de muchos genes que hasta la fecha son meras predicciones génicas.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 El tomate: taxonomía e importancia del cultivo

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una especie dicotiledónea, diploide, con  $2n=2x=24$  cromosomas y perteneciente a la familia *Solanaceae* (Diez & Nuez, 2008). La taxonomía actualmente aceptada de la especie (Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995) es:

Clase: Dicotiledóneas

Orden: Solanales

Suborden: Sonalineae

Familia: Solanaceae

Subfamilia: Solanoideae

Tribu: Solaneae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum* L.

De las más de 3000 especies que se incluyen en la familia *Solanaceae* encontramos cultivos importantes como la patata o el pimiento, si bien el tomate es el más cultivado en todo el mundo y el de mayor valor económico. España es uno de los países con mayor volumen de producción de tomate a nivel mundial, puesto que cultivamos tanto tomate para industria conservera como para consumo fresco, y en este último tipo destaca la producción de Almería por ser la segunda provincia con más volumen de producción en nuestro país. En concreto, en 2012 Almería produjo más de 1 millón de toneladas de tomate, lo que supone un cuarto de la producción anual de España según estadísticas publicadas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2012). La importancia de este cultivo, además de su valor socio-económico, recae en las características nutricionales que presenta y en una excelente capacidad de adaptación a distintos climas, lo que hace que sea agronómicamente interesante (Diez & Nuez, 2008; Jacques et

al., 1989). Por estas características ha sido elegido como la especie modelo para el estudio tanto fisiológico como genético de la maduración del fruto, la tolerancia a algunos tipos de estrés (abióticos y bióticos) y la producción de sustancias antioxidantes (Robertson & Labate, 2007; Saito et al., 2009).

## 1.2 Variabilidad genética de tomate

El centro de diversificación del género *Solanum* se encuentra en la región andina, la cual se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile. A partir de su centro de diversificación fue llevado hasta Centroamérica y México, donde se domesticó y desde ahí fue introducido en Europa (Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995). Habida cuenta que la domesticación consiste en la selección arbitraria de caracteres deseables a través del fenotipo, esta selección fenotípica provoca modificaciones genotípicas, que suponen una disminución de la variabilidad genética de la especie. Como consecuencia de la domesticación del tomate se ha producido una disminución de la variabilidad genética de este cultivo, lo que ha supuesto la pérdida de caracteres importantes, como la resistencia a estreses bióticos, abióticos, la pérdida del sabor del fruto o alteraciones en el proceso de maduración del fruto y en el contenido de sustancias antioxidantes (Blanca et al., 2015; Diez & Nuez, 2008; Emmanuel & Levy, 2002).

## 1.3 Mejora genética

El interés por rescatar algunos de los caracteres que se han visto afectados por la pérdida de variabilidad genética y mejora las variedades comerciales de tomate, ha sido posible gracias a la mejora genética vegetal y al 'Proyecto Internacional de Secuenciación del Genoma de Tomate' (SOL). El proyecto SOL fue llevado a cabo por 30 países y ha permitido el desarrollo de herramientas como

marcadores moleculares y el mapeo de algunos caracteres agronómicos importantes, así como la determinación de la secuencia del genoma de la especie (The Tomato Genome Consortium, 2012), lo que ha hecho posible la disponibilidad de recursos genéticos necesarios para la mejora genética vegetal (Blanca et al., 2015; Saito et al., 2009).

De forma tradicional la mejora genética consiste en la selección de los individuos que presentan el mejor fenotipo (para un carácter de interés) en una población, para mediante cruzamientos fijar dicho carácter en la población. En la actualidad gran parte de la mejora genética es la producción de nuevos cultivares con características mejoradas y diferentes de los cultivares descritos o comercializados. Por tanto, antes de realizar la mejora de un carácter es necesario realizar un análisis genético del mismo (Cubero Salmeró, 2003). En la actualidad son posibles dos tipos de análisis genéticos:

- Análisis genético directo o genética clásica. A partir de la manifestación de un nuevo fenotipo, mediante cruzamientos y análisis de las progenies se puede llegar a conocer el gen o genes responsables de ese nuevo fenotipo. Se lleva desempeñando desde los tiempos de Mendel, y a través de numerosos cruzamientos se puede llegar a conocer la función del gen que ha sido alterado por la mutación, es decir, ir del fenotipo al genotipo (Barkley & Wang, 2008; Emmanuel & Levy, 2002)
- Genética reversa. A partir de la secuencia nucleotídica de un gen o de una variación en una secuencia génica, la genética reversa asocia una función biológica y un fenotipo a dicha secuencia génica, es decir, va del genotipo al fenotipo. El desarrollo de metodologías como TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*), han permitido incrementar el ritmo de asociación secuencia génica-función gracias a la utilización de grandes poblaciones mutagenizadas y al rastreo masivo de dichas mutaciones (Barkley & Wang, 2008) .



Estas nuevas herramientas se basan en la existencia de grandes poblaciones que han sido sometidas a un programa de mutagénesis. Una mutación es cualquier cambio en la cantidad o en la estructura del material genético de un individuo que sea heredable (Nei & Nozawa, 2011). Los tipos de mutaciones pueden ser, según su origen:

- Espontáneas. Aquellas que suceden de forma natural, debido a errores durante la división celular o por la exposición a las condiciones ambientales. Algunos mutantes espontáneos han aportado un gran conocimiento al proceso de maduración y calidad post-cosecha de los frutos de tomate como *ripening inhibitor (rin)* (cuyo fruto no madura), la aparición de este mutante permitió la creación de los frutos larga vida (Saito et al., 2009).
- Inducidas. Aquella mutación que ha sido provocada por la exposición a un agente mutagénico, el cual altera la estructura y/o secuencia del ADN. El primer autor que demostró que las mutaciones podían ser inducidas fue Muller en 1930, el cual provocó mutaciones en *Drosophila melanogaster* tras una exposición a rayos-X (González To, 2014; Muller, 1930).

#### 1.4 Mutagénesis

La base de un programa de mejora vegetal es la variabilidad genética y la principal fuente de variabilidad utilizada para estos programas es la variabilidad natural, la cual está basada en mutaciones espontáneas que ocurren con baja frecuencia. Mediante el uso de mutaciones inducidas puede incrementarse la variabilidad genética de una especie, ya que estas mutaciones ocurren con una alta frecuencia, esto es lo que se conoce como un programa de mutagénesis, donde se aplican diversos agentes mutagénicos que saturan el genoma de mutaciones, aumentando así la variabilidad genética de una especie. Tanto si la mutación es espontánea como inducida, las mutaciones ocurren

en regiones del genoma al azar, por lo que a priori no es posible conocer el resultado (Rubio-Cabetas et al., 2014).

Para realizar un programa de mutagénesis, el agente mutagénico a utilizar debe ser lo suficientemente efectivo para causar las suficientes modificaciones en el ADN y a la vez debe permitir la supervivencia del mayor número de individuos. La efectividad de un agente mutagénico se mide por dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ), es la dosis de dicho agente que impide la supervivencia del 50% de la población (Cubero Salmeró, 2003).

Los agentes mutagénicos se clasifican (Emmanuel & Levy, 2002) en:

- Físicos, como los neutrones rápidos y la radiación ionizante. Provocan tanto roturas físicas en la cadena de ADN (incluso delecciones cromosómicas) como mutaciones puntuales. Generan una gran densidad de mutaciones por todo el genoma.
- Biológicos, como la inserción de T-DNA o trasposones, lo cual no está disponible para todas las especies.
- Químicos como el etilmetano sulfonato o EMS. El EMS es uno de los agentes mutagénicos más utilizados en la actualidad, es un agente alquilante, el cual metila el grupo cetico de la posición 6 de la guanina, esta metilación provoca una alteración en las afinidades de emparejamiento de las bases nitrogenadas, haciendo que el emparejamiento de la guanina sea con la timina y no con la citosina, por tanto causa transiciones de G/C a A/T.

Este agente químico produce mutaciones saturantes en el genoma de carácter irreversible (Henikoff & Comai, 2003; Saito et al., 2009) y presenta una baja tasa de esterilidad (una dosis de EMS de un 1% permite obtener hasta un 60% de células viables) por lo que la mayoría de los mutantes que se generan son viables (Emmanuel & Levy, 2002; Gady et al., 2009).

Estas características han favorecido su uso durante muchos años para estudios de genética clásica, tanto en animales como en vegetales. Por ello, las poblaciones tratadas con EMS son una poderosa fuente de información para la realización de estudios de genética funcional que no podrían ser llevados a cabo solo con los mutantes espontáneos (Lochlainn et al., 2011; McCallum et al., 2000a).

La complejidad de los programas de mejora vegetal en los que se utilizan poblaciones mutagenizadas con agentes químicos se encuentra en la búsqueda o rastreo de los alelos de interés en la población, para ello se han desarrollado técnicas de alto rendimiento que permiten la detección de mutaciones puntuales, lo que ha hecho posible el uso de líneas que han sido mutadas con EMS para realizar genética reversa. Una de estas técnicas es la conocida como TILLING (Emmanuel & Levy, 2002; Henikoff & Comai, 2003).

### 1.5 Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING)

TILLING fue descrita por McCallum et al. en el año 2000, es una estrategia de genética reversa empleada en el campo de la genómica funcional (McCallum et al., 2000a; McCallum et al., 2000b). Esta técnica fue utilizada por primera vez en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (McCallum et al., 2000a, 2000b) y desde entonces se ha extendido su uso a cultivos importantes como tomate o melón, incluso se ha utilizado en animales como *Drosophila* o el pez cebra (McCallum et al., 2000a; Wang et al., 2012). TILLING es una estrategia que permite generar colecciones de mutantes que sirven tanto para analizar la función de los genes mediante la identificación de mutaciones puntuales (polimorfismos en un único nucleótido o *single nucleotide polymorphism* (SNP)) que causen una alteración en la función de los mismos y en el fenotipo asociado, como para el desarrollo de material comercial que presente mutaciones puntuales sin arrastrar un efecto deletéreo de otros caracteres,

por lo que pueden ser utilizados directamente para la mejora vegetal (Saito et al., 2009). La presencia de un SNP y su posición en el genoma puede alterar la función y la expresión de un gen, de ahí la importancia de su búsqueda y caracterización (Jain et al., 2014). Para la búsqueda de polimorfismos en una población mutagenizada, TILLING combina la eficiencia del EMS para crear un elevado porcentaje de mutaciones por todo el genoma, con un método de detección de alto rendimiento basado en la PCR (Henikoff & Comai, 2003; McCallum et al., 2000a, 2000b). Entre las ventajas del TILLING podemos destacar:

1. No requiere el uso de organismos genéticamente modificados y por tanto los mutantes seleccionados mediante este método no presentarán problemas de aceptación social ni de comercialización.
2. Puede ser automatizada y optimizada, lo que permite analizar un gran número de muestras en el mínimo tiempo.
3. Permite la creación de series alélicas, es decir, la obtención de varios alelos para un mismo gen.

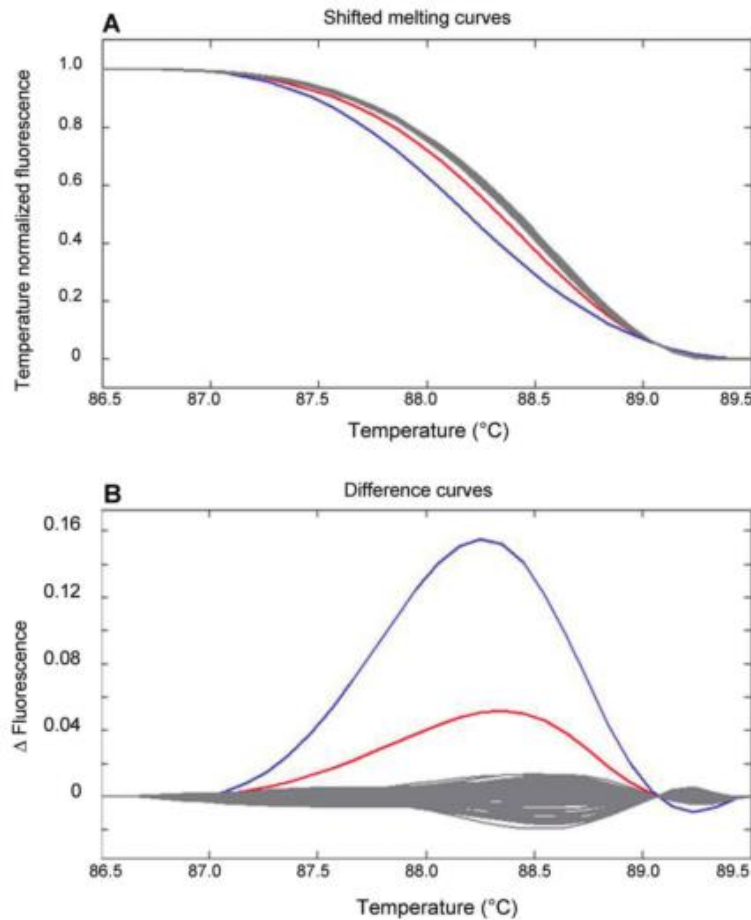
TILLING puede ser llevado a cabo con varias técnicas de detección de mutaciones, la técnica original permite la visualización de los polimorfismos mediante cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento (DHPLC) (McCallum et al., 2000a). Esta técnica permite la separación del ADN mutante del ADN no mutagenizado, debido a la presencia de un heterodúplex (una molécula de ADN de doble hebra en la que se encuentra una zona en forma de hebra sencilla debido a la no complementariedad entre ambas hebras, lo cual está ocasionado por la variación de un nucleótido debido a la aplicación de EMS) en el ADN que porta la mutación (Liu et al., 1998; Wang et al., 2012).

Otra posible estrategia para realizar TILLING es hacer uso de enzimas como CEL1 (Comai & Henikoff, 2006). CEL1 es una endonucleasa descubierta por (Oleykowski et al., 1998) que detecta los

heterodúplex y produce un corte en el extremo 3' de una de las dos hebras. Por ello, mediante la digestión de mezclas de ADN mutante y no mutante y posterior electroforesis en gel desnaturalizante, es posible localizar donde se ha producido la mutación y en que individuos. Este método reduce el coste respecto al uso de DHPLC (Chen et al., 2014; McCallum et al., 2000a, 2000b).

### 1.6 *High-Resolution Melting*

La siguiente técnica que mejoró la eficiencia de TILLING y la que se ha utilizado para realizar su puesta a punto en este trabajo fue la denominada *High-Resolution Melting* (Dong, Vincent, & Sharp, 2009). HRM consiste en la desnaturalización o fusión de un producto de PCR mediante un incremento paulatino de la temperatura, lo que unido a la existencia de fluorocromos específicos de ADN de doble hebra, y a la toma de datos de fluorescencia durante todo el proceso de desnaturalización, permite la formación de curvas de fusión y la identificación de polimorfismos en un único nucleótido o SNP por diferencias entre las mismas. El fluorocromo más utilizado en HRM es "LC Green Plus", el cual permite la identificación incluso de polimorfismos heterocigóticos y homocigóticos (Chen et al., 2014; Gady et al., 2009; Lochlainn et al., 2011; Wang et al., 2012). Un ejemplo de ello lo encontramos en la Figura 1, donde se pueden observar las diferencias entre las curvas de fusión entre distintos individuos, localizando el que porta la mutación.



**Figura 1.** Visualización de las curvas de fusión de varios individuos. En **A** se observa las “curvas de fusión” o disminución de fluorescencia del ADN debido a la desnaturalización conforme aumenta la temperatura. En **B** se observa la ‘Diferencia entre curvas’, en la que una de las curvas más común es elegida como “normal” y a la fluorescencia de todas las curvas se le resta la de las curva normal. Aquellas curvas que muestren mayores diferencias suelen corresponder a ADN de individuos que portan un polimorfismo en su secuencia. Fuente: (Chen et al., 2014).

El siguiente avance para mejorar la eficiencia de TILLING, ha sido posible gracias a la secuenciación del genoma de tomate (The Tomato Genome Consortium, 2012), el proyecto SOL ha aportado gran cantidad de información que ha ayudado a los estudios de genética funcional. Los métodos para caracterizar polimorfismos hasta ahora requerían previamente una localización del individuo que portaba la mutación y posteriormente era necesario secuenciar estos individuos para

caracterizar dicha mutación como ocurre con HRM o con las endonucleasas (Tsai et al., 2011). Con los avances en los métodos de secuenciación, técnicas como TILLING se han beneficiado de dicha información, lo que ha permitido avanzar en la búsqueda de polimorfismos (Kumar & Khurana, 2014). Este nuevo enfoque es llamado 'TILLING mediante secuenciación' y se basa en la identificación de las mutaciones mediante secuenciación masiva y posterior comparación con el genoma de referencia. Es una técnica más rápida que HRM, aunque es mucho más costosa y aún no se ha extendido su utilización.

### 1.7 Aplicación de TILLING para la identificación de polimorfismos.

El contenido en minerales, sustancias antioxidantes, sólidos solubles o el pH son también caracteres de interés que en muchos casos determinan la calidad tanto del tomate procesado como del tomate para consumo fresco. Recientemente el Grupo de investigación AG-176 ha publicado un mapa genético de tomate con un gran número de marcadores genéticos de herencia dominante asociado a algunos de estos caracteres, como son el contenido de ácidos, azúcares, carotenoides, sólidos solubles y vitaminas (Capel et al., 2015). Uno de estos marcadores genéticos, *SL20268i*, se encuentra localizado en el cromosoma 1 y muestra un estrecho ligamiento con caracteres de interés como son el contenido de ácidos y de sólidos solubles del fruto de tomate. Mediante análisis de ligamientos Capel et al., (2015) han determinado que dicho marcador corresponde a un gen candidato de ser responsable tanto del contenido en ácidos como en sólidos solubles. En este trabajo se ha utilizado la plataforma TILLING para realizar Genética reversa e identificar polimorfismos en dicho gen.

Con estos antecedentes, los objetivos de este Trabajo fin de Máster han sido:

- I. Colaborar en la puesta a punto de una plataforma TILLING para la identificación de mutaciones puntuales en poblaciones de tomate mutagenizadas con EMS.
- II. Uso de la plataforma TILLING para su utilización en un programa de Genética reversa e identificar mutantes en un gen de función desconocida.



## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

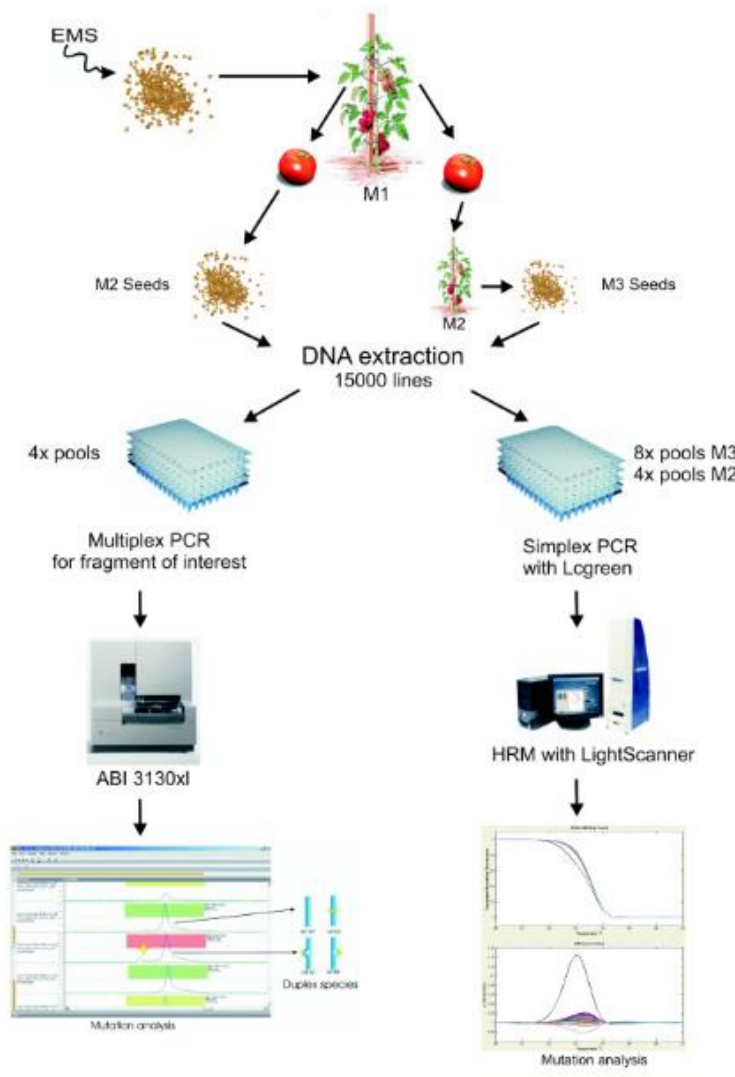
---

### 2.1. Material vegetal

El Grupo de Investigación en el que se ha realizado el Trabajo Fin de Máster de investigación, es el grupo AGR-176, este grupo dispone de una amplia colección de mutantes de tomate del cultivar Moneymaker (MM), cuyas semillas fueron sometidas a tratamientos con EMS y a partir de ellas se generaron las correspondientes poblaciones  $M_1$ . Las plantas de estas poblaciones fueron autofecundadas para disponer de semillas  $M_2$  o familias  $M_2$  (Figura 2) que han sido las utilizadas en la plataforma TILLING.

Como primer paso de la plataforma TILLING, se tomaron 12-16 semillas de 2688 familias de una población  $M_2$  realizada en el cv. Moneymaker (MM). Las semillas de cada familia se colocaron en placas de 96 pocillos de 1,1 ml y se esterilizaron con 200  $\mu$ l de lejía al 50% durante una hora y posteriormente se realizaron dos lavados con 200  $\mu$ l de agua destilada. Tras la esterilización de las semillas, se sembraron en campana de flujo y en condiciones de esterilidad en placas de cultivo in vitro estériles sobre papel de filtro con 450  $\mu$ l de agua destilada.

Tras una semana de crecimiento, se eliminó la testa de la semilla de forma manual (para evitar problemas durante la extracción de ADN) y posteriormente se tomaron las muestras. Las muestras consistieron un mínimo de 6 plántulas por familia que se coloraron en placas de 96 tubos de 1,1 ml con una bola de tungsteno y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Una vez congeladas las 96 muestras, el material vegetal se pulverizó sin descongelar utilizando un molino Retsch MM301 durante 40 segundos a una frecuencia de 30 ciclos/sg y posteriormente se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 2.** Producción de mutantes e identificación de los mismos mediante la plataforma TILLING. El primer paso es la formación de una población M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> a partir de una M<sub>1</sub> mutagenizada con EMS. En este trabajo se ha realizado el itinerario de la derecha: extracción del ADN, formación de *pools* y posterior análisis HRM. Fuente: Gady et al., 2009.

## 2.2. Extracción de ADN genómico

Con el material vegetal congelado y pulverizado, se procedió a la extracción de ADN con el reactivo “Plant DNAzol® Reagent” (Invitrogen), utilizando el protocolo recomendado por el fabricante con los siguientes pasos:

*Extracción de ADN.* Adición de 150 µl de DNAzol al material vegetal hasta descongelar y agitar en el molino Retsch 1 minuto a 20 ciclos/sg, incubar 5 minutos, añadir 150 µl de cloroformo, incubar 5 minutos y agitar bien durante la incubación. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron 10 minutos a 12000 x g. El sobrenadante que contiene el ADN se separó del cloroformo y de los restos vegetales trasasándolo a nuevos tubos de 1,1 ml.

*Precipitación del ADN.* Se añadió al sobrenadante 225 µl de etanol al 100% y se mezcló por inversión, incubamos durante 5 minutos y centrifugamos el ADN durante 5 minutos en las mismas condiciones que en el paso anterior. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet que contenía el ADN.

*Lavado del pellet.* Con tal fin, se añadió 100 µl de una solución DNAzol : Etanol 100% (1 : 0,75) y la mezcla se centrifugó en las mismas condiciones del paso anterior. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet se volvió a lavar con 150 µl de etanol 70% e inversión de los tubos. Tras el lavado, se centrifugaron las placas y se descartó el sobrenadante. Los pellets se dejaron secar 24 h en una campana de extractora de gases.

*Resuspensión del pellet.* Para resuspender el ADN se añadieron 100 µl de agua destilada estéril a cada tubo y se agitaron los tubos hasta observar la resuspensión de los pellet obtenidos.

### 2.3. Cuantificación de ADN y construcción de *pools*

Antes de proceder al análisis, se cuantificó la cantidad de ADN en cada muestra. La cuantificación se realizó mediante un gel de agarosa al 1% en tampón SB 1X (borato sódico), utilizando un marcador de tamaño y concentración conocidos ( $\lambda$ /DNA *Hind*III). Para la cuantificación se tomaron 5 µl de cada muestra y se les añadieron 1 µl de tampón de carga con azul de bromofenol y “gel Red” como

colorante. La electroforesis se realizó a 250V durante 45 minutos, tras los cuales se realizó la visualización del gel mediante una lámpara de luz ultravioleta.

Un paso importante para realizar TILLING es hacer conjuntos de ADN o *pools* con el ADN de las distintas familias, puesto que el número de familias que se analizan es elevado, la construcción de *pools* acelera el proceso de búsqueda. Tras la cuantificación del ADN, se construyeron los *pools*, en cada uno de los cuales se incluyen los ADNs de 4 familias a una concentración de 2,5 ng/μl de ADN por familia, en un volumen final de 100 μl.

#### 2.4. Amplificación del fragmento de interés mediante PCR

Para comprobar que la plataforma TILLING se había puesto a punto de forma correcta y que la sensibilidad que el método de detección de mutaciones utilizado, HRM, era el correcto, se incluyeron semillas del mutante *falsiflora*, gen caracterizado y descrito por el Grupo de Investigación AGR-176 (Molinero-Rosales et al., 1999), y para la realización de un proyecto de genética reversa se utilizó el gen *SL20268i* debido al ligamiento genético que muestra dicho gen con caracteres de calidad organoléptica del fruto (Capel et al., 2015). Por ello, una vez generados los *pools* y los *superpools*, el siguiente paso de la plataforma TILLING fue amplificar mediante PCR un fragmento del gen utilizando como molde el ADN de cada uno de los *superpools*, utilizando cebadores de secuencia conocida y específicos de los genes analizados (Capel et al., 2015; Molinero-Rosales et al., 1999).

Las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen final de 10 μl, para cada reacción se utilizaron los siguientes reactivos:

- 1 μl de ADN de cada *superpool*.
- 5 μl de *HotShot Mastermix*, el cual contiene la enzima Taq DNA polimerasa (esta es inactiva hasta que es incubada a 94°C durante 5 minutos), el buffer y dNTPs.
- 2 μl de H<sub>2</sub>O.

- 0,5 µl de cebador forward y reverse.
- 1 µl de LC Green<sup>TM</sup> Plus+ (Idaho Technology Inc.).
- 15 µl de aceite mineral para evitar la evaporación de los reactivos.

El programa utilizado en el termociclador comenzó con 94°C durante 2 minutos para desnaturalizar el ADN y activar a la ADN polimerasa seguido por 40 ciclos de 5seg a 94°C, 30seg a 62°C, 40seg a 72°C, 1 minuto a 94°C y por último 30°C hasta finalizar el programa.

## 2.5. HRM

Los productos de la amplificación fueron sometidos a HRM, la plataforma utilizada fue LightScanner<sup>®</sup> System (Idaho Technology Inc.). El protocolo utilizado es el descrito por Montgomery et al., 2007. La temperatura de fusión, la cual provoca la desnaturalización de la doble hebra de ADN fue aumentando con una razón de 0,3°C/sg (razón que asegura un compromiso entre calidad y resolución de las curvas de fusión), durante la fusión del ADN se tomaron los datos de fluorescencia (desde los 63,3°C hasta los 95,5°C). Conforme aumenta la temperatura de fusión de forma gradual, la doble hebra se va desnaturalizando, y por tanto la cantidad de fluorescencia emitida por el LC Green Plus va disminuyendo (de forma proporcional a la cantidad de ADN que se desnaturaliza) obteniéndose así las curvas de fusión (Ishikawa et al., 2010).

Las curvas de fusión que se han formado como resultado de la desnaturalización del ADN son comparadas entre los distintos *superpools*, debido a que pequeñas variaciones en la temperatura de fusión pueden deberse a polimorfismos en la secuencia. El análisis de las curvas de fusión se realizó procediendo a la normalización de las curvas de fusión con un nivel máximo de intensidad del 100%, con lo que se eliminan diferencias debidas a la cantidad de fluorescencia, posteriormente se realizaron agrupamientos con una sensibilidad elevada (-4,4) (el agrupamiento de las curvas permite

la separación de los distintos genotipos, de modo que facilita la identificación de heterocigotos y homocigotos). Tras identificar el *superpool* en el que se encuentra un polimorfismo, hay que identificar que familias forman dicho *superpool*, individualizar el ADN de cada familia y repetir el proceso (PCR y HRM) para identificar ahora, que familia es la que presenta la mutación.

## 2.6. Purificación de producto de PCR

Una vez localizada la familia que porta la mutación para el gen en cuestión, el siguiente paso es caracterizar la mutación, para lo cual es necesario secuenciar el fragmento de ADN. Para secuenciar un fragmento de ADN se necesita que este sea lo más puro posible, por tanto tras la amplificación y HRM se procede a la purificación del producto de PCR.

La purificación del producto de PCR se realizó con el kit comercial 'GenElute™ PCR Clean-Up' (SIGMA-ALDRICH®), realizando los siguientes pasos:

1. Colocar la columna de sílice en un eppendorf y añadir 0,5 ml de la solución de preparación de columna a cada una (esta maximiza la unión del ADN a la columna). Centrifugar 1 minuto a 14.000 x g y descartar todo el volumen eluido.
2. Añadir 5 volúmenes de solución de unión por cada volumen de producto de PCR, en nuestro caso 150 µl de solución de unión a 30 µl de producto de PCR. Transferir la solución a la columna, centrifugar 1 minuto a 14.000 x g y eliminar el volumen eluido.
3. Añadir 0,7 ml de la solución de lavado a la columna y centrifugar 1 minuto a 14.000 x g. Eliminar todo el volumen eluido.
4. Sin añadir ninguna otra solución, centrifugar 2 minutos a 14.000 x g (para eliminar los restos de etanol) y traspasar la columna a un tubo limpio.

5. Añadir 50 µl de la solución de elución en el centro de la columna. Centrifugar 1 minuto a 14.000 x g y eliminar la columna.

El producto de PCR estará en el volumen eluido, está listo para su uso o para almacenarlo a -20°C. En nuestro caso la purificación se realizó para hacer posteriormente una secuenciación Sanger, por lo que tras la purificación hay que realizar una PCR para secuenciación.

## 2.7. Reacción de secuenciación y precipitación de ADN

Antes de proceder a la secuenciación del producto de PCR, es necesario realizar una amplificación de dicho producto pero esta vez en cada reacción solo habrá un cebador para generar la secuencia complementaria. Cada una de estas reacciones fue realizada en un volumen final de 10 µl, que contenía:

- 3 µl de producto de PCR purificado
- 1 µl de DNA polimerasa
- 3 µl de H<sub>2</sub>O
- 1 µl de cebador forward/reverse
- 2 µl de buffer

El programa utilizado en el termociclador comenzó con 96°C durante 1 minuto para desnaturalizar el ADN seguido por 10seg a 96°C, 5seg a 50°C, 4min a 60°C, 10seg a 96°C, 5seg a 50°C y por último 1:23 minutos a 60°C durante 25 ciclos.

Tras realizar la amplificación del producto de PCR purificado, los pasos para realizar la precipitación de ADN son los siguientes:

- Añadir 1 µl de acetato sódico 3M, 1 µl de EDTA 0,125M y 25 µl de etanol 95%. Una vez añadidos todos los reactivos, transferir todo el volumen a un eppendorf. Centrifugar 15 minutos a 14.000 x g y tras la centrifugación eliminar todo el volumen.
- Añadir 35 µl de etanol 70%. Centrifugar 10 minutos a 14.000 x g y volver a eliminar todo el volumen.
- Dejar secar para eliminar los restos de etanol, y por último añadir 10 µl de formamida.

## 2.8. Secuenciación y alineamiento de las secuencias

El método de secuenciación utilizado para caracterizar la mutación identificada fue secuenciación Sanger (Sanger & Coulson, 1975), y fue realizada por el Servicio de Secuenciación de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería. La secuencia nucleotídica que presenta el polimorfismo fue comparada mediante un alineamiento con la secuencia nucleotídica de plantas no mutagenizadas para la identificación de la posición y del tipo de polimorfismo, el alineamiento se realizó mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en <http://www.solgenomics.net/tools/blast/>.



### 3. RESULTADOS

---

#### 3.1. Germinación de las semillas y extracción de ADN.

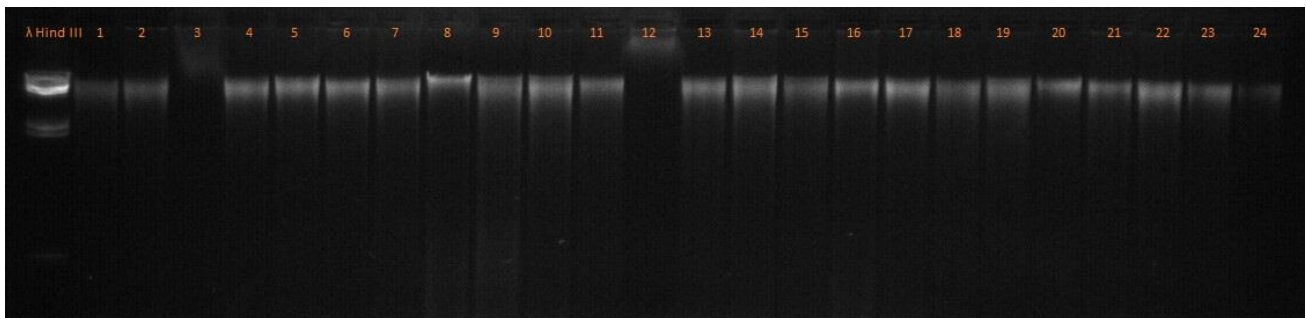
Habida cuenta que las plantas  $M_1$  serán portadoras de las mutaciones en heterocigosis y algunas de esas plantas  $M_1$  son partenocárpicas y no producen descendientes  $M_2$ , la detección de mutaciones mediante TILLING se realiza en plantas  $M_2$ . Como gran parte del peso de las semillas corresponde a la testa, se sembraron entre 12 y 16 de 2688 familias  $M_2$  de una colección de mutantes obtenida en el cultivar Moneymaker (MM) mediante mutagénesis con EMS al 0,7%. La siembra se realizó en condiciones de esterilidad en placas de 12 pocillos. Se dejó crecer las plántulas durante una semana aproximadamente hasta obtener plántulas de 3-4 cm de tamaño (Figura 3). La extracción de ADN solo se les realizó a aquellas familias en las que había germinado un mínimo de 6 descendientes. Cuando el número de plántulas que emergieron fue menor se realizó una nueva siembra de esas familias.



**Figura 3.** Diferencias en el porcentaje de germinación entre dos placas de 12 pocillos con 12 familias cada una. Izquierda: 12 familias con un 100% de germinación. Derecha: Solo en 5 familias encontramos un 50% de germinación o más (6 o más de 6 individuos/familia).

### 3.2 Extracción, cuantificación de ADN y formación de *pools*

Una vez recolectado el material vegetal, se procedió a la purificación de ADN tal y como se describe en detalle en Material y Métodos. La cuantificación de la concentración de ADN genómico se realizó mediante electroforesis y comparación de la fluorescencia del ADN genómico con la que emite el ADN de un marcador de tamaño conocido. Mediante el protocolo de extracción utilizado se obtuvieron concentraciones de hasta 50 ng/μl de ADN genómico para la mayoría de las familias de semillas analizadas. Sin embargo, en la Figura 4 se puede observar un gel para cuantificar la concentración de ADN en el cual hay 24 familias, y se aprecia que las familias 3 y 12 no presentan ADN por causas que se desconocen. Otras familias como la 1 y 2 presentan una concentración de aproximadamente 30 ng/μl, y la familia 5 presenta una concentración aproximada de 40 ng/μl.



**Figura 4.** Imagen de un gel para cuantificar 24 familias. La concentración de cada una de las familias es calculada por la fluorescencia de la banda que contiene el ADN genómico respecto al marcador  $\lambda$ /*Hind* III (cuyas fragmentos de restricción son de concentración conocida).

Teniendo en cuenta que la detección de mutaciones por HRM es muy sensible, es posible la detección de la presencia de una mutación puntual o SNP no solo en un genotipo homocigoto mutante, sino que incluso se detectan mejor en individuos heterocigotos, que muestran curvas de desnaturalización muy características y diferentes de los homocigotos. Además, la sensibilidad de la técnica es tal que es posible detectar una mutación en ADN procedente de un conjunto, o *pool*, de

individuos de la misma familia que se comportarán en la reacción de HRM como un heterocigoto. Pero la sensibilidad del HRM es tan grande que se puede detectar una mutación en ADN procedente un conjunto o *superpool* de distintas familias mutantes, que mostrarían una curva de fusión de ADN similar a la de un heterocigoto. Por ello, y según los datos publicados (Gady et al., 2009) ,tras la cuantificación del ADN de la familias, dicho ADN se agrupó en conjuntos o *superpools* de 4 familias/*superpool*. De esta forma se obtuvieron un total de 672 *superpools*, en los cuales se realizó la optimización de la condiciones de PCR y HRM para la detección de las mutaciones en el gen *FA*, utilizado como control.

### 3.3 Optimización condiciones PCR y HRM

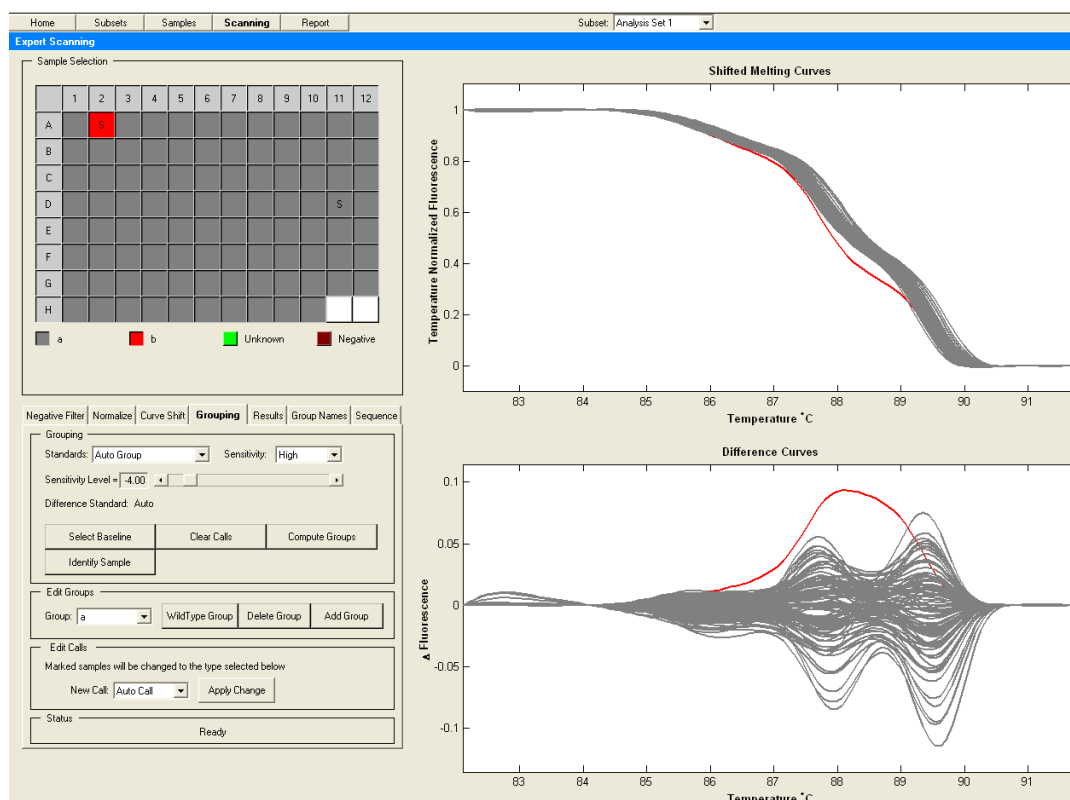
Antes de proceder a la amplificación para el rastreo de mutantes en genes concretos, procedimos a optimizar las condiciones en las que se realizan las reacciones de PCR y HRM, puesto que varios factores pueden afectar a la correcta amplificación. Entre dichos factores destacan: la longitud de los cebadores, concentración de los mismos, concentración de ADN y de ión magnesio. En este trabajo para la realización de las reacciones de HRM se ha utilizado el kit comercial *Mastermix HotShot*, el cual incluye el enzima *Taq* polimerasa, el buffer del enzima (que contiene el ión magnesio) y los dNTPs. Pero en las instrucciones de ese kit advierten que hay que optimizar la concentración de ADN y de cebadores y fue lo que se hizo en reacciones con un amplicón previamente conocido para el gen *FA* (Molinero-Rosales et al., 1999). Después de varias pruebas con distintas concentraciones se determinó que la concentración de ADN necesaria para una correcta amplificación es desde 1 hasta 5 ng/ $\mu$ l y la correcta concentración de cebador es 10  $\mu$ M/ $\mu$ l. Tras la amplificación de cada uno de los

genes en cada uno de los *superpools*, las placas fueron sometidas a HRM para visualizar los posibles polimorfismos.

### 3.4 HRM

#### 3.4.1 Puesta a punto de la plataforma TILLING

Como control positivo de la puesta a punto de la plataforma TILLING se utilizó el mutante *falsiflora* de tomate (Molinero-Rosales et al., 1999). Semillas segregantes para la mutación *fa* se trataron como si de un mutante de EMS se tratase y se incluyeron en un *superpool*. Tras la amplificación con ADN de dicho *superpool* del gen *FA*, se realizó la reacción de HRM y las curvas de fusión fueron analizadas según se ha descrito (Capel et al., 2015) y se obtuvieron las curvas que se muestran en la Figura 5. Tras realizar la normalización las curvas de fusión y realizar el agrupamiento de las mismas con la máxima sensibilidad del método, se observa que una de las curvas del *superpool*, en concreto la del ADN amplificado en la posición 2A, muestra una cinética estadísticamente diferente de la del resto de ADN analizados en ese experimento. Habida cuenta que la posición 2A es donde se encuentra el ADN de la familia segregante del mutante *fa*, pueden considerarse que el método utilizando muestra sensibilidad suficiente para detectar una mutación concreta en un *superpool* de 4 familias de mutantes. Ese resultado se comprobó analizando tanto las 4 familias de mutantes de EMS contenidas en el *superpool* y comparando la gráfica con la obtenida del mutante *fa* y de ADN de la familia segregante para esta mutación.

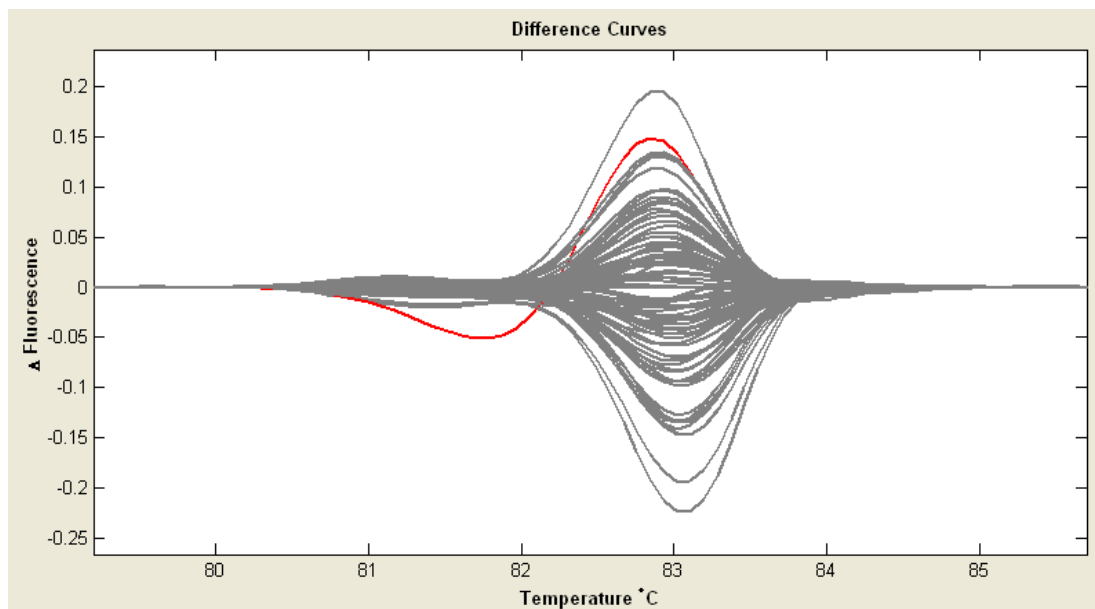


**Figura 5.** Salida de ordenador de HRM tras el análisis de las curvas de fusión del amplicón *FALSIFLORA*. En la parte superior izquierda aparece una representación de la placa de 96 pocillos que ha sido analizada. En la parte superior derecha se muestran las curvas de desnaturalización en función de la temperatura. En la parte inferior izquierda se muestran los parámetros de análisis de las curvas de fusión. En el gráfico inferior derecha se muestra las diferencias entre las distintas curvas de fusión, señalando en rojo la estadísticamente diferente que corresponde a la curva que contiene el ADN del mutante *fa*.

### 3.4.2 Genética reversa

En un estudio recientemente publicado por el Grupo de investigación AGR-176 se ha publicado el mapa genético de tomate con mayor número de marcadores genéticos de herencia codominante (Capel et al., 2015). Uno de los marcadores genéticos, *SL20268i*, localizado en el cromosoma 1 muestra un estrecho ligamiento con varios caracteres de interés agronómico de los publicados como son el contenido en ácidos y en sólidos solubles de los frutos. Dicho marcador corresponde a un gen de función desconocida hasta la fecha, pero su ligamiento con caracteres de interés agronómicos, le convierte en candidato a ser responsable de esos caracteres. Para confirmar esta hipótesis, hemos

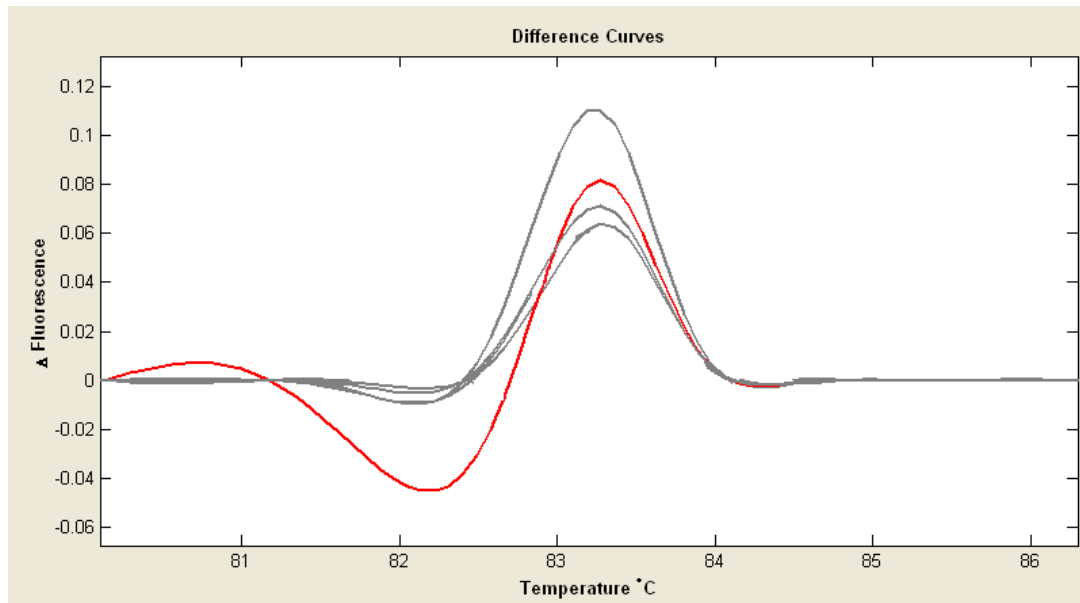
procedido a realizar un estudio de genética reversa de dicho gen, y para ello hemos analizado en los *superpools* de mutantes EMS el amplicón del gen *SL20268i* previamente mapeado (Capel et al., 2015). Tal y como se aprecia en la Figura 6, en un *superpool* se observó una curva de desnaturalización con una cinética significativamente diferente a la del resto de amplicones, lo que indicaría que en ese *superpool* hay contenido ADN de al menos una planta portadora de una mutación para ese gen.



**Figura 6.** Representación gráfica de la diferencia en las curvas de fusión entre 96 amplicones del marcador molecular *SL20268i* en un *superpool*. La curva en rojo muestra diferencias significativas con el resto, lo que indicaría la presencia en ese *superpool* de al menos un polimorfismo en este gen.

Tras la detección de un *superpool* en el que un amplicón del gen *SL20268i* muestra una curva de fusión con diferente cinética, se identificaron las familias que conforman dicho *superpool* y se realizaron amplificaciones de ese gen con ADN de esas familias de mutantes. En concreto este *superpool* está compuesto con ADN de las familias UAL8152, UAL8158, UAL8164 y UAL8181. Tras realizar la amplificación del gen correspondiente al marcador molecular en estas familias de

forma independiente, y tras analizar las curvas de fusión de las mismas, se observó una familia que mostraba una cinética de desnaturalización significativamente diferente al resto de familias analizadas (Figura 7), con un patrón muy similar al observado en el *superpool* de ADN de las cuatro familias (Figura 6).



**Figura 7.** Representación gráfica de las curvas de fusión de las familias UAL8152, UAL8158, UAL8164 y UAL8181, la familia UAL8158 es la que presenta una cinética de fusión que indica la presencia de polimorfismos en la secuencia nucleotídica del gen *SL20268i*.

### 3.5 Caracterización del polimorfismo

Tras identificar la familia que presenta una cinética HRM que indica la presencia de una mutación en la secuencia del gen correspondiente al marcador molecular, se realizó una siembra de plantas de esa familia de mutantes EMS. Cuando las plantas alcanzaron el tamaño suficiente se procedió a la extracción de ADN y la determinación de la secuencia del gen en cada una de esas plantas M<sub>2</sub>. De esta forma se ha confirmado que esa familia de mutantes está segregando para una mutación en la secuencia codificante del gen *SL20268i*, en concreto una transición G por A en la posición 311 del

marco abierto de lectura del gen (ORF) que afectaría a la segunda posición del correspondiente codón.

Nucleótidos en la posición 310-312 del alelo normal	-----AGT-----
	----- S -----
Nucleótidos en la posición 310-312 del alelo mutante	-----AAT-----
	----- R -----

Figura 8. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del alelo normal y del alelo mutante identificado del gen *SL20268i*

Este cambio nucleotídico se traduce en un cambio de aminoácido, de serina a asparagina, por tanto la mutación provocada por él EMS en esta familia podría provocar una alteración en la proteína resultante, cuya función actualmente es desconocida. En la actualidad las plantas mutantes, así como las plantas hermanas de secuencia normal y plantas heterocigotas portadoras de la mutación está creciendo y está previsto su trasplante a invernadero donde serán caracterizadas agronómicamente en detalle. Se prestará especial atención a los caracteres de calidad organoléptica de los frutos a los que el marcador *SL20268i* mostraba estrecho ligamiento genético, para comprobar si este gen es el responsable de alguno de esos caracteres que podrían estar relacionados con el tamaño de los frutos.



## 4. DISCUSIÓN

---

El TILLING es una estrategia de Genética reversa que permite la identificación de mutaciones concreta en poblaciones mutagenizadas. Estas nuevas mutaciones pueden ser utilizadas tanto para mejora genética vegetal como para estudios de genómica funcional (McCallum et al., 2000a; Okabe et al., 2011; Wang et al., 2012), con la ventaja de excluir la necesidad de incorporar ADN foráneo, esta es una de las razones de su éxito y por la que la numerosos autores apoyan esta herramienta (McCallum et al., 2000a; Emmanuel & Levy, 2002; Barkley & Wang, 2008).

En el trabajo realizado y expuesto en esta memoria TFM se ha participado en todos los pasos necesarios para la puesta a punto de una plataforma TILLING en tomate, desde la germinación de las semillas a la construcción de *superpools* de ADN, y se ha realizado un estudio de genética reversa hasta la identificación de una mutación en una gen ligado a caracteres de interés agronómico. Para ello se ha hecho uso de una población mutagenizada con EMS formada por 2688 familias y de la técnica HRM. HRM es una técnica de alta resolución basada en el comportamiento de las curvas de fusión o desnaturalización del ADN que permite detectar polimorfismos en un único nucleótido con gran resolución, minimizando el coste y el tiempo de screening en grandes poblaciones (Dong et al., 2009; Gady et al., 2009; Lochlainn et al., 2011).

Para la puesta a punto de la plataforma TILLING se utilizó como control un mutante conocido y previamente caracterizado (Molinero-Rosales et al., 1999). De esa forma fue posible ajustar los parámetros de las reacciones de PCR y HRM desde la normalización hasta el agrupamiento siguiendo el protocolo de Montgomery et al. (2007) para, finalmente, identificar con suficiente resolución este mutante, el cual se encontraba en un *superpool* que contenía ADN de otras 3 familias mutantes de EMS con alelos normales del gen *FA*. Los resultados obtenidos (Figura 5) confirmaban que habíamos puesto a punto la plataforma TILLING en nuestras condiciones.

A continuación procedimos al rastreo de la colección de mutantes utilizando un amplicón de un gen, *SL20268i*, que muestra ligamiento a caracteres de interés agronómico tales como el alto contenido en sólidos solubles de los frutos (Capel et al., 2015). En el rastreo de polimorfismos en la secuencia del marcador molecular se ha identificado un polimorfismo en una población de 2688 familias mutantes de EMS que hemos analizado. Estos resultados difieren de los descritos por Emmanuel & Levy (2002) que identificaron 20 mutaciones en una población mutagenizada de *Arabidopsis* compuesta por 3000 familias y predecían que el número de mutaciones no debería diferir en tomate. Más recientemente Piron et al., (2010) identifican hasta 256 mutantes en una población de 4759 individuos utilizando un total de 19 genes. Resultados similares describen Silletti et al., (2012) que identificaron un total de 9 mutaciones en 8 líneas distintas de *S.lycopersicum* mutagenizadas con EMS. Probablemente ese número de polimorfismos tan elevado descrito por dichos autores sea debido al que realizan el rastreo con un número muy elevado de genes y de amplicones para cada gen. En nuestro caso hemos analizado un amplicón para el gen control *FA* y un amplicón para el gen *SL20268i*.

En 2009 Gady et al., describieron el rastreo mediante TILLING de poblaciones  $M_2$  y  $M_3$  de *S.lycopersicum* y observaron en una población  $M_2$  menos de la mitad de los polimorfismos observados rastreando una población  $M_3$ . En el mismo trabajo también analizan la importancia del tamaño de los *superpools*, pues con 8 familias por *superpool* observan falsos positivos y negativos que no aparecen analizando *superpools* compuestos de 4 familias. El tamaño de los *superpools* en este trabajo no habría ocasionado problemas ya que los *superpools* realizados contienen 4 familias cada uno. Sin embargo, en nuestras condiciones resulta muy costoso el análisis de plantas  $M_3$  y solo es posible el análisis de poblaciones  $M_2$ .

También se ha descrito que la las dosis elevada de EMS puede causar mutaciones letales en  $M_1$  o partenocarpia y una dosis muy baja del mutágeno puede causar pocas modificaciones en el genoma (González, 2014). En nuestro caso la población mutagenizada ya estaba disponible y en su puesta a punto se optimizó tanto la dosis de EMS como el tiempo de mutagénesis (Capel J, comunicación personal).

En cualquier caso, en este TFM hemos tenido éxito y tras el rastreo de la colección de mutantes hemos encontrado un mutante para el gen *SL20268i*. Tras caracterizar el polimorfismo detectado, se observa una transición de guanina a adenina, resultado que indica que esa mutación ha debido ser causada por el EMS. Numerosos autores (Emmanuel and Levy, 2002; Gady et al., 2009) han observado que el EMS provoca transiciones de G:C a A:T. En este trabajo la mutación ocasiona un cambio de aminoácido que podría provocar alteraciones en la funcionalidad de la proteína resultante, aunque para confirmar este extremo será necesario la caracterización fenotípica de las plantas homocigotas para la mutación.

## 5. CONCLUSIÓN

---

Se ha realizado la puesta a punto de la plataforma TILLING de forma satisfactoria y con suficiente resolución como para detectar polimorfismos en un único nucleótido (SNP).

El rastreo de la colección de mutantes con esta plataforma TILLING ha permitido la identificación de un mutante en un gen correspondiente a un marcador molecular asociado a un QTL de importancia agronómica.

La caracterización de los mutantes observados puede suponer una importante aportación a la genómica funcional y a la mejora genética de tomate.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- Barkley, N. A., & Wang, M. L. (2008). Application of TILLING and EcoTILLING as Reverse Genetic Approaches to Elucidate the Function of Genes in Plants and Animals. *Current Genomics*, 9(4), 212–26.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., ... Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16(1), 257.
- Capel, C., Fernández del Carmen, A., Alba, J. M., Lima-Silva, V., Hernández-Gras, F., Salinas, M., ... Lozano, R. (2015). Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Chen, L., Hao, L., Parry, M. A. J., Phillips, A. L., & Hu, Y.-G. (2014). Progress in TILLING as a tool for functional genomics and improvement of crops. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(5), 425–43.
- Comai, L., & Henikoff, S. (2006). TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 45(4), 684–94.
- Cubero Salmeró, J. I. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal*. (S. A. Mundi-Prensa Libros, Ed.) (2ª ed, p. 600).
- Diez, M. J., & Nuez, F. (2008). Tomato. In J. Prohens & F. Nuez (Eds.), *Vegetales II: Handbook of plant breeding* (pp. 249–327). Springer New York.
- Dong, C., Vincent, K., & Sharp, P. (2009). Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor. *BMC Plant Biology*, 9(1), 143.
- Emmanuel, E., & Levy, A. a. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 112–117.
- Esquinas-Alcázar, J., & Nuez, F. (1995). *Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate*. (Mundi-Prensa, Ed.) (El cultivo, pp. 13–42). Madrid.
- Gady, A. L., Hermans, F. W., Van de Wal, M. H., van Loo, E. N., Visser, R. G., & Bachem, C. W. (2009). Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods*, 5(1), 13.
- González To, M. (2014). *DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE TILLING EN MELÓN (Cucumis melo L.)*. Universitat Autònoma de Barcelona.

- Henikoff, S., & Comai, L. (2003). SINGLE-NUCLEOTIDE MUTATIONS FOR PLANT FUNCTIONAL GENOMICS. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 375–401.
- Ishikawa, T., Kamei, Y., Otozai, S., Kim, J., Sato, A., Kuwahara, Y., ... Todo, T. (2010). High-resolution melting curve analysis for rapid detection of mutations in a Medaka TILLING library. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 70.
- Jacques, H., Maarten, K., M.S, R., & Pim, Z. (1989). Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytica*, 42, 1–23.
- Jain, M., Moharana, K. C., Shankar, R., Kumari, R., & Garg, R. (2014). Genomewide discovery of DNA polymorphisms in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response and their functional relevance. *Plant Biotechnology Journal*, 12(2), 253–64.
- Kumar, R., & Khurana, A. (2014). Functional genomics of tomato: Opportunities and challenges in post-genome NGS era. *Journal of Biosciences*, 39(5), 917–929.
- Liu, W., Smith, D. I., Rechtzigel, K. J., Thibodeau, S. N., & James, C. D. (1998). Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations. *Nucleic Acids Research*, 26(6), 1396–1400.
- Lochlainn, S. O., Amoah, S., Graham, N. S., Alamer, K., Rios, J. J., Kurup, S., ... Broadley, M. R. (2011). High Resolution Melt (HRM) analysis is an efficient tool to genotype EMS mutants in complex crop genomes. *Plant Methods*, 7(1), 43.
- MAGRAMA. (2012). Superficies y producciones de cultivos 2012.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. a, & Henikoff, S. (2000a). Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*, 123(b), 439–442.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A., & Henikoff, S. (2000b). Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology*, 18(4), 455–7.
- Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Zurita, S., Gomez, P., Capel, J., & Lozano, R. (1999). FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal*, 20(6), 685–693.
- Montgomery, J., Wittwer, C. T., Palais, R., & Zhou, L. (2007). Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols*, 2(1), 59–66.
- Muller, H. J. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Journal of Genetics*, 22(3), 299–334.
- Nei, M., & Nozawa, M. (2011). Roles of mutation and selection in speciation: from Hugo de Vries to the modern genomic era. *Genome Biology and Evolution*, 3, 812–29.

- Okabe, Y., Asamizu, E., Saito, T., Matsukura, C., Ariizumi, T., Brès, C., ... Ezura, H. (2011). Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant & Cell Physiology*, 52(11), 1994–2005.
- Oleykowski, C. A., Bronson Mullins, C. R., Godwin, A. K., & Yeung, A. T. (1998). Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 26(20), 4597–4602.
- Piron, F., Nicolaï, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., ... Bendahmane, A. (2010). An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS One*, 5(6), e11313.
- Robertson, L. D., & Labate, J. a. (2007). Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives. In *Genetic Improvement of Solanaceous Crops* (Vol. 2, pp. 25–75).
- Rubio-Cabetas, M. J., Picó, B., Casas, A., & Badenes, M. L. (2014). Aplicación de la biotecnología en los programas actuales de mejora. In R. Socías, M. J. Rubio-Cabetas, C. Mallor, & J. M. Álvarez (Eds.), *La obtención de variedades : desde la mejora clásica hasta la mejora genética molecular* (pp. 97–137). Biovegen.
- Saito, T., Asamizu, E., Mizoguchi, T., Fukuda, N., Matsukura, C., & Ezura, H. (2009). Mutant Resources for the Miniature Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) “Micro-Tom.” *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(1), 6–13.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448.
- Silletti, M. F., Petrozza, A., Stigliani, A. L., Giorio, G., Cellini, F., D’Ambrosio, C., & Carriero, F. (2012). An increase of lycopene content in tomato fruit is associated with a novel Cyc-B allele isolated through TILLING technology. *Molecular Breeding*, 31(3), 665–674.
- The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–41.
- Tsai, H., Howell, T., Nitcher, R., Missirian, V., Watson, B., Ngo, K. J., ... Comai, L. (2011). Discovery of rare mutations in populations: TILLING by sequencing. *Plant Physiology*, 156(3), 1257–68.
- Wang, T. L., Uauy, C., Robson, F., & Till, B. (2012). TILLING in extremis. *Plant Biotechnology Journal*, 10(7), 761–72.